



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENTAMT



⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 195 43 635 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁶:
C 08 L 67/04
C 08 J 5/04
D 04 H 1/58
// C 08 G 63/06 (C12P
7/62, C12R 1:01) B60R
13/01, 13/02, 13/08

②1 Aktenzeichen: 195 43 635.0
②2 Anmeldetag: 23. 11. 95
④3 Offenlegungstag: 28. 5. 97

RECEIVED
MAR 28 2002
GROUP 3600

DE 195 43 635 A 1

⑦1 Anmelder:
HP-Chemie Pelzer Research and Development Ltd.,
Waterford, IE

⑦4 Vertreter:
Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,
50667 Köln

⑦2 Erfinder:
Pelzer, Helmut, 58454 Witten, DE; Steinbüchel,
Alexander, Prof. Dr., 58454 Witten, DE

⑤6 Entgegenhaltungen:
DE 44 16 357 A1
US 53 50 627 A
WO 96 06 886 A1
JP 02-1 11 503 A

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Verbundwerkstoffe aus Polyhydroxyfettsäuren und Fasermaterialien

⑤7 Die Erfindung betrifft einen Verbundwerkstoff aus Faser-
material und Bindemittel, dadurch gekennzeichnet, daß das
Bindemittel ein Polymer einer Hydroxyfettsäure ist, Verfah-
ren zur Herstellung des Verbundwerkstoffs sowie Faserma-
terial abbauende Mikroorganismen mit der Fähigkeit zur
Synthese von Hydroxyfettsäurepolymeren.

DE 195 43 635 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Verbundwerkstoffe aus Polyhydroxyfettsäuren als Bindemittel und Fasermaterialien, Verfahren zu deren Herstellung sowie hierfür geeignete Mikroorganismen.

Verbundwerkstoffe, beispielsweise Textilfaservliese, bestehen aus Fasermaterialien und einem verknüpfenden Bindemittel. Als Bindemittel werden dabei hauptsächlich Phenolharze verwendet, deren Umweltverträglichkeit jedoch zweifelhaft ist.

Textilfaservliese sind im Automobilbereich ein häufig verwendeter Konstruktionswerkstoff mit breitem Eigenschaftsspektrum. Beispielsweise wird Phenolharz-gebundenes Textilvlies seit langem unter anderem wegen seiner guten Dämpfungseigenschaften als Werkstoff für tragende und verkleidete Teile (rein oder als Verbundwerkstoff) in der Automobilindustrie im PKW- und LKW-Bau eingesetzt. Als kostengünstige Flachware diente dieses Produkt zunächst und ausschließlich Polsterzwecken. In jüngster Zeit stellte sich dieser Werkstoff jedoch in einer Reihe von Varianten dar, und ist vielseitig verwendbar. Formteile werden besonders bevorzugt.

Phenolharz-gebundenes Textilvlies ist in Rohdichten von 50 bis 1000 kg/cm³ bei Dicken von 5 bis 30 mm im Handel erhältlich. Es ist als sogenanntes Porenkomposit, bestehend aus drei Phasen (Baumwolle, gehärtetes Phenolharz und Luft) zu beschreiben — ein Konstruktionswerkstoff, dessen Eigenschaftsprofil in weiten Grenzen modifiziert werden kann. Baumwolle hat die Faserform, Phenolharz liegt punktförmig, auch netzflächig als eine Art Matrix vor.

Durch besondere Auswahl der Vliesstoffe kann die Akustik und die Festigkeit des Verbundwerkstoffs besonders gesteuert werden. Besonders bevorzugte Materialien zur Herstellung des Vliesstoffes sind Glasfaser-verstärkte oder Glasgitter-verstärkte Fasermaterialien, insbesondere Bindemittel enthaltende Textilvliese, vorzugsweise solche, die aus einem Baumwollmischgewebe bestehen. Diese Vliese werden durch Pressen bei erhöhter Temperatur auf die gewünschte Festigkeit gebracht.

Die besonderen Eigenschaften und die Leistungsfähigkeit dieser letztgenannten Produktgruppe erklären sich aus der chemischen und morphologischen Struktur der Baumwolle, sowie dem Duroplastcharakter der ausgehärteten Phenolharze, die üblicherweise als Bindemittel der Baumwollmischgewebvliese eingesetzt werden. Weitere Einflußgrößen sind die Verformbarkeit, die Bügelfähigkeit der Baumwolle, die statistische Bindepunkthäufigkeit und auch die Laminat- und/oder Mantelwirkung der längs von Fasern haftenden und so auch auskondensierten Bindemittelmoleküle.

Die Baumwolle übersteht den Fertigungsprozeß praktisch ohne Veränderung ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaftsmerkmale. Sie verleiht dem Produkt besondere Qualitätsmerkmale wie Schall-Absorptionsfähigkeit, gute mechanische Festigkeitswerte, Schlagzähigkeit und Splitterfestigkeit in der Kälte.

Besonders bevorzugte Bindemittel für die Vliesstoffe sind ausgewählt aus Phenol-Formaldehyd-Harzen, Epoxidharzen, Polyesterharzen, Polyamidharzen, Polypropylen, Polyethylen und/oder Ethylvinylacetatcopolymeren. Phenolharze haben nach der Härtung die typischen Duroplasteigenschaften, die sich auf das Fertigprodukt übertragen. Das Textilvlies wird aus der Reißbaumwolle und dem pulvrigen Phenolharz üblicherweise auf trockenem Wege hergestellt. Die Aushärtung erfolgt entweder im Heizkanal oder über das ungehärtete Halbzeug als Zwischenstufe in der Presse. Für die Teile, die im Fahrzeugraum Verwendung finden sollen, wird ausgewähltes Textil eingesetzt.

Weiterhin bekannt sind Holzfaservlieswerkstoffe als ein Holzwerkstoff, zu dessen Herstellung man zerspantes und gehacktes Abfallholz mit Hilfe von Dampfdruck und Wärme zu einem Faserbrei verarbeitet. Dabei werden einige Cellulosebindungen aufgeschlossen. Dem Brei mischt man üblicherweise geringe Mengen an Bindemittel aus Kunstharz (z. B. Phenol-, Alkyd-, Harnstoff-Harze), Flammenschutzmittel, Schädlingsbekämpfungsmittel (gegen Insekten und Pilzbefall) und dergleichen bei, formt den Brei auf Formmaschinen zu meist plattenförmigen Faserplatten und entwässert.

Derartige Holzfaservlieswerkstoffe werden als Dämmstoffe gegen Kälte, Wärme und Schall, als Zwischenwände, Tisch- und Fußbodenbeläge usw. auch lackiert und mit Kunstharzfilm beschichtet.

Im Verlauf des Herstellungsprozesses wird das Holz-Fasermaterial geformt, verdichtet und gepreßt. Hierbei wird primär die Verfilzung der Fasern und deren natürliche Bindekraft genutzt. Durch Zugabe von Binde- und Hydrophobierungsmitteln sowie durch thermische und andere Nachbehandlungen lassen sich die Bindekräfte erhöhen. So können die physikalischen und die Festigkeitseigenschaften dem Verwendungszweck angepaßt werden.

Nach DIN 68753 unterscheidet man bei Holzfaserwerkstoffen folgende Arten:

harte Holzfaserplatten mit einer Rohdichte von mehr als 800 kg/m³,

mittelharte Holzfaserplatten mit einer Rohdichte von mehr als 350 kg/m³ bis 800 kg/m³ und

poröse Holzfaservlieswerkstoffe, auch Isolier- oder Dämmplatten genannt, mit einer Rohdichte von 250 bis 350 kg/m³.

Aus dem Derwent Abstract 90-168 964 und der damit korrespondierenden JP-A-0 211 15 03, sind Formkörper bekannt, die aus Holzfasern und Bindemitteln sowie Glasfasermatten in einem laminierten Zustand bestehen. Der Formkörper wird für Innenauskleidungsteile von Automobilen und elektrischen Schaltschränken verwendet. Dem Material werden gute Dimensionsstabilität und verbesserte Festigkeit sowie akustische Absorptionseigenschaften zugeschrieben.

Das holzartige Formmaterial wird hergestellt durch Zugabe von 5 bis 30 Gew.-% eines phenolischen Bindemittels zur Bindung der holzartigen Fasern. Glasfasermatten werden dadurch erhalten, daß man diese ebenfalls mit einer Phenolharzlösung imprägniert und anschließend trocknet. Die Glasfasermatten werden dann auf einer porösen Platte plaziert und das holzartige Formmaterial auf die Matte aufgesprüht. Nachdem das holzartige Formmaterial die erwünschte Dicke erreicht hat, wird das Aufsprühen gestoppt und eine Platte aufgebracht, um ein Verbundmaterial zu erhalten. Dieses wird in einem Formwerkzeug unter Druck zu einem Kraftfahrzeughim-

mel-Grundmaterial geformt.

Weiterhin ist von einer großen Zahl von Bakterien bekannt, daß sie unter geeigneten Wachstumsbedingungen, bei denen ein Überschuß einer Kohlenstoffquelle, gleichzeitig aber ein Mangel an einem essentiellen Nährsalz im Medium vorliegt, intrazellulär große Mengen Polyhydroxyfettsäuren (PHF) speichern. Eine Übersicht ist in A. Steinbüchel, "Polyhydroxyalkanoic acids" In: D. Byrom, Hrsg., Biomaterials, Macmillan Publishers Ltd., Basingstoke, S. 123—213 (1991) gegeben. Diese Polyhydroxyfettsäuren stellen in der Regel lineare Polyester aus 3-Hydroxyfettsäuren dar, wobei in Einzelfällen auch 4-Hydroxy- oder 5-Hydroxyfettsäuremonomere gefunden werden. Die Eigenschaften der bakteriellen Polymere hängen entscheidend von der Länge der Seitenkette der Monomere und von den Monomerkombinationen ab. So ist Poly-3-hydroxybuttersäure (PHB) hart und spröde, während Poly-3-hydroxydekansäure (PHD) gummiartig verformbar ist. Meist bestehen die Polyester aus Einheiten mehrerer Monomeren mit unterschiedlichen Zusammensetzungen. Bei einigen Polymeren, wie beispielsweise Copoly-3-hydroxybuttersäure-3-hydroxyvaleriansäure (PHB/HV), kann die Stoffmengen-Zusammensetzung bei der mikrobiologischen Herstellung durch die Zugabe von unterschiedlichen Kohlenstoffquellen gesteuert werden. In anderen Polymeren, wie PHD (bestehend aus 30 mol% 3-Hydroxyoctanoat, 50 mol% 3-Hydroxydecanoat, 10 mol% 3-Hydroxydodecanoat und weiteren gesättigten und ungesättigten 3-Hydroxyfettsäuren) sind der Variabilität teilweise enge Grenzen gesetzt. Technische Anwendungen dieser Polymere sind jedoch nicht vorhanden.

Das Problem der vorliegenden Erfindung bestand darin, die genannten und gegebenenfalls neuen Polyhydroxyfettsäuren einer neuen Verwendung zuzuführen und ein neuartiges Bindemittel für Verbundwerkstoffe zur Verfügung zu stellen, das gegenüber Phenolharzen eine bessere biologische Abbaubarkeit zeigt, aus natürlichen Rohstoffen leicht herstellbar ist und eine gleiche oder erhöhte mechanische Stabilität des Verbundwerkstoffes gewährleistet.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß sich Polymere von Hydroxyfettsäuren als Bindemittel für Verbundwerkstoffe eignen.

Gegenstand der Erfindung ist demgemäß in einer ersten Ausführungsform ein Verbundwerkstoff aus Fasermaterial und Bindemittel, das dadurch gekennzeichnet ist, daß das Bindemittel aus einem Polymer von Hydroxyfettsäuren besteht.

Mit Hilfe der vorliegenden Erfindung ist es möglich, in an sich bekannten Verbundwerkstoffen ein neuartiges Bindemittel einzusetzen.

Die erfindungsgemäßen Verbundwerkstoffe sind durch die besonderen Eigenschaften wie die hohe Steifigkeit zur Herstellung von Textilfaservliesen, insbesondere Glasfaserverstärkten oder Glasgitter-verstärkten Fasermaterialien und Baumwollvliesen besonderes geeignet. Hier ist ein teilweise oder vollständiger Ersatz der üblicherweise eingesetzten Phenolharzbindemittel möglich.

Das eingesetzte Bindemittel verleiht den Verbundwerkstoffen akustische Eigenschaften, die sich aus der Porosität des Materials ergeben, wodurch den Materialien eine besondere Eignung für den Automobilbereich zukommt.

Verbundwerkstoffe im Sinne der vorliegenden Erfindung enthalten vorzugsweise Naturfasern, insbesondere ausgewählt aus Flachs, Sisal, Hanf, Holzwohle, Holzschliff, Holzfasern, Kokosfasern, Watte, Heu, Stroh, Sägemehl, Hobelspänen, Kiefernspänen, Spelzen, Samenresten, Haferflocken, Getreide, Kleie, Papierstreifen und Baumwollreste aber auch Kunstfasern, wie Polybutylenterephthalate, Polyethylenterephthalate, Nylon 6, Nylon 66, Nylon 12, Viskose oder Rayon als Textilfaser.

Die Polymere von Hydroxyfettsäuren, die gemäß der vorliegenden Erfindung als Bindemittel in Verbundwerkstoffen eingesetzt werden, leiten sich vorzugsweise von gesättigten oder ungesättigten 3-Hydroxyfettsäuren mit 4 bis 16 Kohlenstoffatomen im Fettsäurerest ab. Wird die Kettenlänge des Fettsäurerestes beispielsweise durch die biologischen Bedingungen bei der Herstellung der Polymeren zu kurz gewählt, so wird das Polymer zu spröde, während ein langer Kohlenstoffrest dazu führt, daß die Festigkeit des Materials abnimmt.

Neben Homopolymeren aus einem Monomer von Hydroxyfettsäuren ist es beispielsweise durch die Auswahl der mikrobiologischen Bedingungen möglich, Gemische von Polyhydroxyfettsäuren und somit auch Copolymere oder auch Terpolymere zu erhalten.

Besonders bevorzugt besteht das Polymer von Hydroxyfettsäuren aus Poly-3-hydroxybuttersäure (PHB), Copolymer-poly-3-hydroxybuttersäure-3-hydroxyvaleriansäure (PHB/HV) in etwa äquimolen Anteilen und Poly-3-hydroxydodekansäure oder Gemischen derselben.

Die Art und Menge der einzusetzenden erfindungsgemäßen Bindemittel wird im wesentlichen durch den Anwendungszweck des Verbundwerkstoffes bestimmt. So wird im allgemeinen der Einsatz von 5 bis 50 Gew.-%, insbesondere 20 bis 40 Gew.-% bezogen auf den Verbundwerkstoff sinnvoll sein. Für den Fall, daß noch weitere an sich übliche Bindemittel in dem Verbundwerkstoff eingesetzt werden sollen, ist es jedoch möglich, die Menge des erfindungsgemäßen Bindemittels zu vermindern.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung besteht in der besonderen Eignung der Polymeren von Hydroxyfettsäuren zur Herstellung von Verbundwerkstoffen im Automobilbereich. Besonders bevorzugt werden die erfindungsgemäßen Verbundwerkstoffe zur akustischen Dämpfung in Bereichen Motorhaube, Stirnwand (beidseitig), Tunnel, Tür, Dach, Fußraum und dem Lüftungskanal, sowie gegebenenfalls als selbsttragende Basis für Innenauskleidungen, insbesondere für Amaturenableckungen, Tunnelverkleidungen, Türverkleidungen, Rücklehnverkleidungen und Reserveabdeckungen sowie für Teile mit Doppelfunktion, insbesondere als Dachhimmel, Hutablage, Füllstück, Kofferraummatte und Radhausverkleidung eingesetzt.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung besteht im Verfahren zur Herstellung der genannten Verbundwerkstoffe, wobei man das Fasermaterial mit dem Bindemittel in Kontakt bringt und anschließend zu dem Verbundwerkstoff verpreßt. Hierbei werden die Fasermaterialien mit den Bindemitteln in geeigneter Weise kombiniert und durch Verpressen bei einer Temperatur im Bereich der Raumtemperatur oder oberhalb

des Schmelzbereiches des Bindemittels, jedoch unterhalb des Zersetzungsbereichs des Bindemittels erhalten. Besonders bevorzugt im Sinne der vorliegenden Erfindung ist ein Temperaturbereich von 120 bis 250°C, insbesondere 180 bis 250°C, da bisher im Stand der Technik verwendete Verbundwerkstoffe, insbesondere Textilfaservliese im Automobilbereich auch bei einer derartigen Temperatur gepreßt werden.

Die mikrobiologische Herstellung der Polymeren von Hydroxyfettsäuren mittels Mikroorganismen ist an sich bekannt. Hierzu ist es möglich, die im Handel frei zugängliche Mikroorganismen einzusetzen und durch geeignete Verfahren zu vermehren.

Eine erste Variante des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens der Verbundwerkstoffe besteht darin, daß man das Fasermaterial mit isoliertem und gereinigtem Polymer von Hydroxyfettsäuren vermischt und bei entsprechender Temperaturführung verpreßt. Hierbei wird ein besonders reiner, optisch ansprechender Verbundwerkstoff erhalten, der im Sichtbereich gegebenenfalls ohne Kaschierung eingesetzt werden kann.

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung der Verbundmaterialien besteht darin, das Fasermaterial mit getrockneten Polymer von Hydroxyfettsäuren enthaltenen Mikroorganismen oder einer Paste derselben zu vermischen. Hier wird also der Mikroorganismus nicht von den Polymeren von Hydroxyfettsäuren befreit, sondern zusammen mit diesem in dem Verbundwerkstoff eingearbeitet.

Eine weitere Variante des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens besteht darin, die Polymere von Hydroxyfettsäuren produzierenden Mikroorganismen in Anwesenheit des Fasermaterials der herzustellenden Verbundwerkstoffe und einer weiteren Kohlenstoffquelle anzuziehen, die Bakterien samt den Fasern zu ernten und in getrocknetem oder feuchten Zustand, gegebenenfalls unter Einsatz weiteren Fasermaterials und Verbundwerkstoffen zu pressen. Bei dieser Variante wird also das Fasermaterial selbst teilweise als Nahrungsmittel für die Mikroorganismen eingesetzt. Bei dieser Verfahrensweise wurde die Freisetzung von PHF-Ganalien aus Zellen von *alcaligenes eutrophus* in Gegenwart feinverteilt vorliegender Cellulosefasern beobachtet.

Eine weitere Möglichkeit der Herstellung der erfindungsgemäßen Verbundmaterialien besteht darin, ohne weitere Kohlenstoffquelle die Mikroorganismen anzuziehen, wobei das Fasermaterial allein als Kohlenstoffquelle dient.

Besonders bevorzugt im Sinne der vorliegenden Erfindung wird ein PHF-Synthese-exprimierender-rekombinanter Mikroorganismus eingesetzt.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele näher erläutert:

Beispiele

Beispiel 1

Die Fähigkeit zur Herstellung Poly-3-hydroxydecanäure (PHD) ist auf die taxonomische Gruppe der Pseudomonaden beschränkt. Da jedoch Polyester wie PHD oder das nahe verwandte Poly-3-hydroxyoctanoat (PHO) bislang nicht in größeren Mengen hergestellt wurden, mußte zunächst ein geeigneter Stamm für die Produktion gefunden werden. Hierzu wurden zunächst im Handel frei erhältliche Stämme der Gattung *Pseudomonas* auf die Verwertung von preiswerten Substraten wie Gluconat, Glucose oder Saccharose (Haushaltszucker) sowohl auf festen Medien, wie auch in Flüssigkultur getestet (Tab. 1). Zur Kultivierung wurde ein definiertes Mineralmedium nach Schlegel et al. (1961) mit der im folgenden aufgeführten Zusammensetzung eingesetzt.

Die nachfolgend in der Tabelle genannten Stämme sind der Öffentlichkeit frei zugänglich, da diese bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig geführt werden. Anstelle der genannten Stämme führen auch andere hinterlegte Stämme zu vergleichbaren Ergebnissen.

Tabelle 1
Fermentationsbedingungen zur Herstellung von PHD in unterschiedlichen Pseudomonas Species

| | Organismus | Substrat ^{a)} | Medium ^{b)} | Dauer (h) | Kulturvolumen (l) | Trockengewicht (g/l) | PHF (%ZTM) | PHF (g/l) |
|---|------------------------------|-----------------------------|---|-----------|-------------------|----------------------|------------|-----------|
| 1 | P. putida KT2442 | 10 % Gluconat | 30 x MM | 72 | 7 | 18,0 | 2,6 | 0,4 |
| 2 | P. mendocina (DSM 50017) | 10 % Gluconat | 2xNH ₄ Cl 3xMg/Ca/Fe 3xSL6 | 93 | 30 | 8,5 | 47,5 | 4,0 |
| 3 | P. citroneolliis (DSM 50332) | 6 % Gluconat | 2xNH ₄ Cl 2xMg/Ca/Fe 2xSL6 | 75 | 8 | 6,9 | 85,7 | 5,8 |
| 4 | P. citroneolliis (DSM 50332) | 3 % Gluconat | 1,5xNH ₄ Cl 2xMg/Ca/Fe 2xSL6 | 95 | 30 | 3,2 | 73,6 | 2,3 |
| 5 | P. sp. (DSM1650) | 4 % Saccharose | 1xMM | 48 | 8 | 3,0 | 27,5 | 0,8 |
| 6 | P. putida KT2442 | 4 % Gluconat | 1xMM | 24 | 250 | 3,4 | 62,1 | 2,1 |
| 7 | P. putida KT2442 | 4 % Gluconat | 1xMM 1,5xNH ₄ Cl | 36 | 250 | 4,4 | 72,8 | 3,2 |
| 8 | A. eutrophus H16 (DSM 428) | 4 % Gluconat | 2 x MM | 43 | 250 | 9,4 | 73,2 | 6,9 |
| 9 | A. eutrophus H16 (DSM 428) | 2 % Gluconat 1 % Valerat | 2xMM | 58 | 250 | 5,6 | 69,1 | 3,9 |

a), Die Substrate wurden in 2%(w/v)-Portionen zugegeben.

b), Die in der Literatur (Schlegel et.al. 1961) angegebene Menge der betreffenden Substanz wird als 1 x gerechnet, SL, Spurenelementlösung SL6. Die Abkürzungen der Substanzen beziehen sich auf die entsprechenden Salze (s. Medium). ZTM, Zelltrockenmasse.

Mineralmedium (Schlegel et al. 1961):

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O} = 9,00 \text{ g}$

$\text{KH}_2\text{PO}_4 = 1,50 \text{ g}$

$\text{NH}_4\text{Cl} = 1,00 \text{ g}$

5 $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O} = 0,20 \text{ g}$

$\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O} = 0,02 \text{ g}$

$\text{Fe(III)NH}_4\text{-Citrat} = 1,20 \text{ mg}$

SL6 (Pfennig, N. 1974) = 0,10 ml

$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}} - \text{ad } 1000 \text{ ml, pH } 6,9$

10

Bei den Versuchen wurde insbesondere auf die Schnelligkeit des Wachstums und der Polymerspeicherung sowie auf verminderte Schaumbildung geachtet. Unter zusätzlicher Berücksichtigung von Literaturangaben (Haywood G.W. Anderson, A.J. & Dawes, E.A. (1989b) "A survey of the accumulation of novel polyhydroxyalkanoates by bacteria" Biotechnol. Lett. 11, 471—476; Huisman, G.W., De Leeuw, O., Eggink, G. & Witholt, B. (1989) "Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads" Appl. Environ. Microbiol. 55, 1949—1954; Timm, A. & Steinbüchel, A. (1990) "Formation of polyesters consisting of medium-chainlength 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by Pseudomonas aeruginosa and other fluorescent pseudomonads" Appl. Environ. 56, 3360—3367) wurden insbesondere die Stämme P. putida KT 2442, P. citronellolis, P. mendocina, P.sp. 15a und P.sp. 45C als mögliche Mikroorganismen für die Herstellung von PHF ausgewählt. In parallel durchgeführten Versuchen, in denen Glucose beziehungsweise Gluconat als Kohlenstoffquelle eingesetzt wurde, zeigte sich, daß Gluconat in der Regel das bessere Substrat für die Synthese von PHF darstellte.

15

20

25

30

Vier dieser Stämme wurden in Probefermentationen im 10 l- beziehungsweise 30-l-Maßstab angezogen (Tabelle 1). Hierbei erwies sich ein Herstellungsprozeß unter Verwendung von P. putida KT2442 und Gluconat als Kohlenstoffquelle zunächst als günstig, da der Polymergehalt in diesem Stamm schon zu einem frühen Zeitpunkt im Bereich der logarithmischen Wachstumsphase sehr hoch war. Da die anderen untersuchten Stämme erst zu einem späteren Verlauf des Wachstums PHF synthetisierten, konnte der Prozeß unter Verwendung von P. putida KT2442 mit einem weitaus geringerem Zeitaufwand durchgeführt werden. Die unter 2 und 3 aufgeführten Fermentationen der Tabelle 1 mit P. medocina und P. citronellolis erbrachten zwar höhere Ausbeuten an Zelltrockenmasse beziehungsweise PHF pro Liter Kultur, benötigten jedoch neben dem höheren Zeitaufwand größere Mengen an Nährsalzen und Gluconat. Auch P. putida KT2442 konnte zu höheren Zelldichten als die unter 5 und 6 (Tabelle 1) beschriebenen angezogen werden, wie Fermentation 1 (Tabelle 1) zeigte.

35

40

Schwierigkeiten bei der Fermentationen mit Pseudomonaden lagen in einer nahezu nicht kontrollierbaren Schaumbildung, wenn der pH-Wert des Mediums parallel mit dem Verbrauch von Natriumgluconat in einen alkalischen pH-Wertbereich übergang. Es war möglich, das Schäumen der Kultur, das zu einem beträchtlichen Verlust der gebildeten Zellmasse durch Austragen der Biomasse aus dem Bioreaktor führte, durch Nachtitrieren mit konzentrierter Phosphorsäure, die Zugabe von großen Mengen Entschäumern (Polypropylenglycol, unverdünnt) und eine geringere Umdrehungszahl des Rührers zu vermindern. Die Maßnahmen bergen jedoch die Gefahr der Schädigung der Bakterien durch zu hohe Chemikalienkonzentrationen. Geringe Umdrehungszahlen des Rührwerkes führen zu geringen Sauerstoffkonzentrationen, die den Speicherungsprozeß von PHD verlangsamen oder verhindern.

Beispiel 2

45

50

Zur Gewinnung von PHD wurden ca. 1 kg lyophilisierte Zellen von P. putida KT2442 aus den Anzuchten Nr. 6 und 7 (Tabelle 1) im Soxhlet-Extraktor mit 7,5 l Chloroform sieben Tage extrahiert. Die PHF-haltige Chloroform-Lösung wurde im Rotationsverdampfer eingedunstet und gemäß Lageveen, R.G. Huisman, G.W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G. & Witholt, B., (1988) "Formation of polyesters by pseudomonas oleovorans: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates", Appl. Environ. Microbiol. 54,2924—2932, das Polymer durch Fällung im zehnfachen Volumen Ethanol isoliert. Es resultierten ca. 360 g gereinigtes PHD, was einer Ausbeute von ca. 55% des möglichen Wertes entsprach.

55

60

65

Als günstigste Menge zum Pressen von Fasermaterialien wurden 3 g ermittelt, da mit dieser Menge die Kapazität der Preßzelle gut ausgenutzt war und ein Preßling genügender Stärke resultierte. Aufgrund der gummiartigen Konsistenz des PHD wurde, um eine ausreichende Verteilung des Polymers innerhalb des Fasermaterials zu gewährleisten, PHD in Chloroform gelöst und mit dieser Lösung gleichmäßig alle Fasern benetzt.

Ein Volumen von 20 ml Chloroform (im Falle von Sisal 5 ml, bei Holzwolle und Hanf 10 ml) reichten aus, um von 3 g Fasermaterial vollständig aufgenommen zu werden. Es wurden daher Lösungen von 0,5 bis 20% (w/v) PHF (PHB— siehe Tabelle 2, PHD — siehe Tabelle 3, Gemische von PHF — siehe Tabelle 4) Chloroform hergestellt, mit dem Fasermaterial versetzt und das Lösungsmittel durch Verdunsten über Nacht entfernt. Die PHD-benetzten Fasern wurden dann unter den in Tabellen 2 bis 5 angegebenen Bedingungen gepreßt. So erwiesen sich 2-bis 10-%ige PHD-Lösungen offensichtlich als die am besten geeigneten Konzentrationen zur Herstellung von Verbundmaterialien aus PHD und Baumwollresten, Flachs oder Sisal oder Hanf. Die Preßlinge besaßen damit PHD-Anteile zwischen 11 und 40%. Bei der Verwendung von Watte trat das Polymer schon bei geringen Konzentration aus der Zelle aus und Polymeranteile zwischen 6 und 14% erschienen hier als günstig. Die Ergebnisse sind in Tabellen 2 bis 5 zusammengefaßt.

Tabelle 2

Herstellung von Probepreßlingen aus isoliertem PHB (bestehend aus 100 mol% polymerem 3-Hydroxybutyrat) und verschiedenen Fasermaterialien

| Fasermaterial (g) | CHCl ₃ (ml) | PHB (g) | Lösung (%) | Anteil PHB (%) | Druck (bar) | Zeit (min) | Temp. Zelle (°C) | Bemerkungen |
|-------------------|------------------------|---------|------------|----------------|-------------|------------|------------------|------------------------|
| Baumwollreste | | | | | | | | |
| 3 | 0 | 0,23 | - | 7,1 | 200 | 5 | 180 | - ohne Lösungsmittel |
| 3 | 0 | 0,30 | - | 9,1 | 200 | 5 | 180 | - ohne Lösungsmittel |
| 3 | 0 | 0,45 | - | 13,1 | 200 | 5 | 180 | +/- ohne Lösungsmittel |
| 3 | 0 | 0,60 | - | 16,7 | 200 | 5 | 180 | +/- ohne Lösungsmittel |
| 3 | 20 ⁷ | 0,5 | 2,5 | 14,3 | 200 | 5 | 180 | wäßr.Suspension |
| 3 | 20 ⁷ | 1,0 | 5,0 | 25,0 | 200 | 5 | 180 | wäßr.Suspension |
| 3 | 0 | 0 | - | 0 | 200 | 5 | 180 | - Blindprobe |
| 3 | 20 | 0,4 | 2,0 | 11,8 | 200 | 5 | 180 | ++ |
| 3 | 20 | 1,0 | 5,0 | 25,0 | 200 | 5 | 180 | +++ |
| 3 | 20 | 1,5 | 7,5 | 33,3 | 200 | 5 | 180 | +++ zuviel Polymer |
| 3 | 20 | 2,0 | 10,0 | 40,0 | 200 | 5 | 180 | +++ zuviel Polymer |
| 3 | 20 | 0,05 | 0,25 | 1,6 | 200 | 5 | 180 | - |
| 3 | 20 | 0,1 | 0,5 | 3,2 | 200 | 5 | 180 | +/- |

| Fasermaterial (g) | CHCl ₃ (ml) | PHB (g) | Lösung (%) | Anteil PHB (%) | Druck (bar) | Zeit (min) | Temp. Zelle (°C) | Bemerkungen |
|----------------------|---------------------------|------------|---------------|-------------------|----------------|---------------|---------------------|-------------|
| 3 | 20 | 0,2 | 1,0 | 6,2 | 200 | 5 | 180 | +/- |
| 3 | 20 | 0,3 | 1,5 | 9,1 | 200 | 5 | 180 | + |
| Flachs | | | | | | | | |
| 3 | 20 | 0,33 | 1,65 | 9,9 | 200 | 5 | 180 | ++ |
| 3 | 20 | 0,75 | 3,75 | 20,0 | 200 | 5 | 180 | +++ |
| Sisal | | | | | | | | |
| 3 | 5 | 0,33 | 6,6 | 9,9 | 200 | 5 | 180 | ++ |
| 3 | 5 | 0,75 | 14,0 | 20,0 | 200 | 5 | 180 | +++ |
| Hanf | | | | | | | | |
| 3 | 10 | 0,33 | 3,3 | 9,9 | 200 | 5 | 180 | ++ |
| 3 | 10 | 0,75 | 7,5 | 20,0 | 200 | 5 | 180 | +++ |
| Holzwolle | | | | | | | | |
| 3 | 10 | 0,33 | 3,3 | 9,9 | 200 | 5 | 180 | ++ |
| 3 | 10 | 0,75 | 7,5 | 20,0 | 200 | 5 | 180 | +++ |
| Watte | | | | | | | | |
| 3 | 20 | 0,33 | 1,65 | 9,9 | 200 | 5 | 180 | ++ |
| 3 | 20 | 0,75 | 3,75 | 20,0 | 200 | 5 | 180 | +++ |
| Heu | | | | | | | | |
| 3 | 5 | 0,33 | 6,6 | 9,9 | 200 | 5 | 180 | ++ |
| 3 | 5 | 0,75 | 14,0 | 20,0 | 200 | 5 | 180 | +++ |
| Stroh | | | | | | | | |
| 3 | 5 | 0,33 | 6,6 | 9,9 | 200 | 5 | 180 | ++ |
| 3 | 5 | 0,75 | 14,0 | 20,0 | 200 | 5 | 180 | +++ |

| Fasermaterial (g) | CHCl ₃ (ml) | PHB (g) | Lösung (%) | Anteil PHB (%) | Druck (bar) | Zeit (min) | Temp. Zelle (°C) | Bemerkungen |
|----------------------|---------------------------|------------|---------------|-------------------|----------------|---------------|---------------------|----------------|
| Sägemehl | | | | | | | | |
| 6 | 20 | 0,66 | 3,3 | 9,9 | 200 | 5 | 180 | ++ |
| 6 | 20 | 1,5 | 7,5 | 20,0 | 200 | 5 | 180 | +++ |
| Spelzen | | | | | | | | |
| 6 | 20 | 0,66 | 3,3 | 9,9 | 200 | 5 | 180 | ++ |
| 6 | 20 | 1,5 | 7,5 | 20,0 | 200 | 5 | 180 | +++ |
| Hobelspäne | | | | | | | | |
| 6 | 20 | 0,66 | 3,3 | 9,9 | 200 | 5 | 180 | ++ |
| 6 | 20 | 1,5 | 7,5 | 20,0 | 200 | 5 | 180 | +++ |
| Kiefernspäne | | | | | | | | |
| 6 | 20 | 0,66 | 3,3 | 9,9 | 200 | 5 | 180 | ++ |
| 6 | 20 | 1,5 | 7,5 | 20,0 | 200 | 5 | 180 | +++ |
| Samenreste | | | | | | | | |
| 12 | 10 | 1,32 | 13,2 | 9,9 | 200 | 5 | 180 | - Öl tritt aus |
| Haferflocken | | | | | | | | |
| 12 | 10 | 1,32 | 13,2 | 9,9 | 200 | 5 | 180 | - |
| Roggen | | | | | | | | |
| 12 | 10 | 1,32 | 13,2 | 9,9 | 200 | 5 | 180 | - |
| Kleie | | | | | | | | |
| 6 | 10 | 0,66 | 6,6 | 9,9 | 200 | 5 | 180 | + |
| Papierstreifen | | | | | | | | |
| 6 | 10 | 0,66 | 6,6 | 9,9 | 200 | 5 | 180 | ++ |
| 6 | 10 | 1,5 | 15,0 | 20,0 | 200 | 5 | 180 | +++ |

Bewertung: - = ungeeignete; + = geeignete; ++ = gut geeignete;
 +++ = sehr gut geeignete; - Kombination von Fasermaterial und Polyhydroxyfettsäure(n) in Preßlinge einheitlicher Verteilung beider Komponenten und mit hoher Festigkeit herstellbar *) Lösungsmittel Wasser

Tabelle 3

Herstellung von Probepreßlingen aus isoliertem PHD (bestehend aus 3 mol% polymerem 3-Hydroxyhexanoat, 20 mol% polymerem 3-Hydroxyoctanoat, 75 mol% polymerem 3-Hydroxydecanoat und 2 mol% polymerem 3-Hydroxydodecanoat) und verschiedenen Fasermaterialien.
 Der Bewertungsmaßstab entspricht der Tabelle 2.

| Fasermaterial (g) | CHCl ₃ (ml) | PHD (g) | Lösung (%) | Anteil PHD (%) | Druck (bar) | Zeit (min) | Temp. Zelle (°C) | Bemerkungen |
|----------------------|---------------------------|------------|---------------|-------------------|----------------|---------------|---------------------|-------------------------|
| Baumwollreste | | | | | | | | |
| 1 | 0 | 1,0 | - | 50,0 | 200 | 5 | 75 | - ohne Lösungsmittel |
| 3 | 0 | 0,5 | - | 14,3 | 200 | 5 | 75 | - ohne Lösungsmittel |
| 3 | 20 | 0 | 0 | 0 | 200 | 5 | 75 | - Blindprobe |
| 3 | 20 | 0,1 | 0,5 | 3,2 | 200 | 5 | 75 | - zuwenig Polymer |
| 3 | 20 | 0,2 | 1,0 | 6,2 | 200 | 5 | 75 | +/- zuwenig Polymer |
| 3 | 20 | 0,4 | 2,0 | 11,8 | 200 | 5 | 75 | ++ |
| 3 | 20 | 1,0 | 5,0 | 25,0 | 200 | 5 | 75 | +++ |
| 3 | 20 | 1,5 | 7,5 | 33,3 | 200 | 5 | 75 | +++ |
| 3 | 20 | 2,0 | 10,0 | 40,0 | 200 | 5 | 75 | +++ |
| 3 | 20 | 3,0 | 15,0 | 50,0 | 200 | 5 | 75 | +++ zuviel Polymer |
| 3 | 20 | 4,0 | 20,0 | 57,1 | 200 | 5 | 75 | +++ zuviel Polymer |

| Fasermaterial (g) | CHCl ₃ (ml) | PHD (g) | Lösung (%) | Anteil PHD (%) | Druck (bar) | Zeit (min) | Temp. Zelle (°C) | Bemerkungen |
|----------------------|---------------------------|------------|---------------|-------------------|----------------|---------------|---------------------|-----------------------|
| Flachs | | | | | | | | |
| 3 | 20 | 0 | 0 | 0 | 200 | 5 | 75 | - Blindprobe |
| 3 | 20 | 0,1 | 0,5 | 3,2 | 200 | 5 | 75 | - zuwenig Polymer |
| 3 | 20 | 0,2 | 1,0 | 6,2 | 200 | 5 | 75 | +/- zuwenig Polmer |
| 3 | 20 | 0,4 | 2,0 | 11,8 | 200 | 5 | 75 | ++ |
| 3 | 20 | 1,0 | 5,0 | 25,0 | 200 | 5 | 75 | +++ |
| 3 | 20 | 1,5 | 7,5 | 33,3 | 200 | 5 | 75 | +++ |
| 3 | 20 | 2,0 | 10,0 | 40,0 | 200 | 5 | 75 | +++ |
| 3 | 20 | 3,0 | 15,0 | 50,0 | 200 | 5 | 75 | +++ zuviel Polymer |
| 3 | 20 | 4,0 | 20,0 | 57,1 | 200 | 5 | 75 | +++ zuviel Polymer |
| Sisal | | | | | | | | |
| 3 | 5 | 0 | 0 | 0 | 200 | 5 | 75 | - Blindprobe |
| 3 | 5 | 0,1 | 2 | 3,2 | 200 | 5 | 75 | - |
| 3 | 5 | 0,25 | 5 | 7,7 | 200 | 5 | 75 | +/- |
| 3 | 5 | 0,37 | 7,5 | 11,0 | 200 | 5 | 75 | + |
| 3 | 5 | 0,5 | 10 | 14,3 | 200 | 5 | 75 | +++ |
| 3 | 5 | 0,75 | 15 | 20,0 | 200 | 5 | 75 | +++ |
| 3 | 5 | 1,0 | 20 | 25,0 | 200 | 5 | 75 | +++ |

| Fasermaterial (g) | CHCl ₃ (ml) | PHD (g) | Lösung (%) | Anteil PHD (%) | Druck (bar) | Zeit (min) | Temp. Zelle (°C) | Bemerkungen |
|----------------------|---------------------------|------------|---------------|-------------------|----------------|---------------|---------------------|-----------------------|
| Hanf | | | | | | | | |
| 3 | 10 | 0 | 0 | 0 | 200 | 5 | 75 | - Blindprobe |
| 3 | 10 | 0,2 | 2 | 6,2 | 200 | 5 | 75 | +/- |
| 3 | 10 | 0,5 | 5 | 14,3 | 200 | 5 | 75 | +++ |
| 3 | 10 | 0,75 | 7,5 | 20,0 | 200 | 5 | 75 | +++ |
| 3 | 10 | 1,0 | 10 | 25,0 | 200 | 5 | 75 | +++ |
| Holzwolle | | | | | | | | |
| 3 | 10 | 0 | 0 | 0 | 200 | 5 | 75 | - Blindprobe |
| 3 | 10 | 0,2 | 2 | 6,2 | 200 | 5 | 75 | - |
| 3 | 10 | 0,5 | 5 | 14,3 | 200 | 5 | 75 | + |
| 3 | 10 | 0,75 | 7,5 | 20,0 | 200 | 5 | 75 | ++ |
| 3 | 10 | 1,0 | 10 | 25,0 | 200 | 5 | 75 | +++ |
| Watte | | | | | | | | |
| 3 | 20 | 0 | 0 | 0 | 200 | 5 | 75 | - Blindprobe |
| 3 | 20 | 0,4 | 2 | 11,8 | 200 | 5 | 75 | ++ |
| 3 | 20 | 1,0 | 5 | 25,0 | 200 | 5 | 75 | +++ |
| 3 | 20 | 2,0 | 10 | 40,0 | 200 | 5 | 75 | +++ zuviel Polymer |
| 3 | 20 | 1,5 | 7,5 | 33,3 | 200 | 5 | 75 | +++ zuviel Polymer |
| Heu | | | | | | | | |
| 3 | 5 | 0 | | | 200 | 5 | 75 | - Blindprobe |
| 3 | 5 | 0,37 | 7,4 | 11,0 | 200 | 5 | 75 | ++ |
| 3 | 5 | 0,5 | 10 | 14,3 | 200 | 5 | 75 | +++ |

| Fasermaterial (g) | CHCl ₃ (ml) | PHD (g) | Lösung (%) | Anteil PHD (%) | Druck (bar) | Zeit (min) | Temp. Zelle (°C) | Bemerkungen |
|----------------------|---------------------------|------------|---------------|-------------------|----------------|---------------|------------------------|--------------|
| Stroh | | | | | | | | |
| 3 | 5 | | | | 200 | 5 | 75 | - Blindprobe |
| 3 | 5 | 0,37 | 7,4 | 11,0 | 200 | 5 | 75 | + |
| 3 | 5 | 0,5 | 10 | 14,3 | 200 | 5 | 75 | +++ |
| Sägemehl | | | | | | | | |
| 3 | 10 | 0 | | 0 | 200 | 5 | 75 | - Blindprobe |
| 3 | 10 | 0,33 | 3,3 | 9,9 | 200 | 5 | 75 | +/- |
| 3 | 10 | 0,75 | 7,5 | 20,0 | 200 | 5 | 75 | + |
| 6 | 20 | 0,66 | 3,3 | 9,9 | 200 | 5 | 75 | + |
| 6 | 20 | 1,5 | 7,5 | 20,0 | 200 | 5 | 75 | ++ |
| Hobelspäne | | | | | | | | |
| 3 | 10 | 0 | | 0 | 200 | 5 | 75 | - Blindprobe |
| 3 | 10 | 0,33 | 3,3 | 9,9 | 200 | 5 | 75 | +/- |
| 3 | 10 | 0,75 | 7,5 | 20,0 | 200 | 5 | 75 | ++ |
| 6 | 20 | 0,66 | 3,3 | 9,9 | 200 | 5 | 75 | ++ |
| 6 | 20 | 1,5 | 7,5 | 20,0 | 200 | 5 | 75 | ++ |
| Kiefernspäne | | | | | | | | |
| 3 | 10 | 0 | | 0 | 200 | 5 | 75 | - Blindprobe |
| 3 | 10 | 0,33 | 3,3 | 9,9 | 200 | 5 | 75 | +/- |
| 3 | 10 | 0,75 | 7,5 | 20,0 | 200 | 5 | 75 | + |
| 6 | 20 | 0,66 | 3,3 | 9,9 | 200 | 5 | 75 | ++ |
| 6 | 20 | 1,5 | 7,5 | 20,0 | 200 | 5 | 75 | ++ |

| Fasermaterial (g) | CHCl ₃ (ml) | PHD (g) | Lösung (%) | Anteil PHD (%) | Druck (bar) | Zeit (min) | Temp. Zelle (°C) | Bemerkungen |
|-----------------------|---------------------------|------------|---------------|-------------------|----------------|---------------|---------------------|------------------|
| Spelzen | | | | | | | | |
| 3 | 10 | 0 | | 0 | 200 | 5 | 75 | - Blindprobe |
| 3 | 10 | 0,33 | 3,3 | 9,9 | 200 | 5 | 75 | +/- |
| 3 | 10 | 0,75 | 7,5 | 20,0 | 200 | 5 | 75 | + |
| 6 | 20 | 0,66 | 3,3 | 9,9 | 200 | 5 | 75 | ++ |
| 6 | 20 | 1,50 | 7,5 | 20,0 | 200 | 5 | 75 | ++ |
| Samenreste | | | | | | | | |
| 12 | 5 | 0 | | 0 | 200 | 5 | 75 | - Blindprobe |
| 12 | 5 | 0,33 | 6,6 | 2,7 | 200 | 5 | 75 | - Öl tritt aus |
| 12 | 5 | 0,75 | 15,0 | 5,9 | 200 | 5 | 75 | - Öl tritt aus |
| 12 | 10 | 3,00 | 30,0 | 20,0 | 200 | 5 | 75 | +/- Öl tritt aus |
| 12 | 10 | 1,37 | 13,7 | 10,2 | 200 | 5 | 75 | +/- Öl tritt aus |
| Haferflocken | | | | | | | | |
| 12 | 10 | 0 | | 0 | 200 | 5 | 75 | - Blindprobe |
| 12 | 10 | 0,33 | 3,3 | 2,7 | 200 | 5 | 75 | - |
| 12 | 10 | 0,75 | 7,5 | 5,9 | 200 | 5 | 75 | +/- |
| 12 | 10 | 1,37 | 13,7 | 10,2 | 200 | 5 | 75 | +/- |
| 12 | 10 | 3,00 | 30,0 | 20,0 | 200 | 5 | 75 | + |
| Roggen | | | | | | | | |
| 12 | 10 | 0 | | 0 | 200 | 5 | 75 | - Blindprobe |
| 12 | 10 | 1,37 | 13,7 | 10,2 | 200 | 5 | 75 | +/- |
| 12 | 10 | 3,00 | 30,0 | 20,0 | 200 | 5 | 75 | +/- |
| Kleie | | | | | | | | |
| 6 | 10 | 0 | | 0 | 200 | 5 | 75 | - Blindprobe |
| 6 | 10 | 0,66 | 6,6 | 9,9 | 200 | 5 | 75 | ++ |
| 6 | 10 | 1,50 | 15,0 | 20,0 | 200 | 5 | 75 | +/- |
| Papierstreifen | | | | | | | | |
| 6 | 10 | 0 | | 0 | 200 | 5 | 75 | - Blindprobe |
| 6 | 10 | 0,66 | 6,6 | 9,9 | 200 | 5 | 75 | +/- |
| 6 | 10 | 1,50 | 15,0 | 20,0 | 200 | 5 | 75 | ++ |

Tabelle 4

Herstellung von Probepreßlingen aus Polymergemischen (PHB/HV enthaltend 8% HV) von Polyhydroxyfett-säuren und Baumwollresten.

Der Bewertungsmaßstab entspricht der Tabelle 2.

| Fasermaterial (g) | CHCl ₃ (ml) | PHF (g) | Lösung (%) | Anteil Polymer (%) | Druck (bar) | Zeit (min) | Temp. Zelle (°C) | Bemerkungen |
|----------------------|---------------------------|------------|---------------|--------------------------|----------------|---------------|---------------------|---------------------------|
| 3 | 0 | 0,23 | - | 7,1 | 200 | 5 | 150 | +/- ohne Lösungsmittel |
| 3 | 0 | 0,30 | - | 9,1 | 200 | 5 | 150 | + ohne Lösungsmittel |
| 3 | 0 | 0,45 | - | 13,0 | 200 | 5 | 150 | +++ ohne Lösungsmittel |
| 3 | 0 | 0,60 | - | 16,7 | 200 | 5 | 150 | +++ ohne Lösungsmittel |
| 3 | 20 | 0,4 | 2,0 | 11,8 | 200 | 5 | 150 | ++ |
| 3 | 20 | 1,0 | 5,0 | 25,0 | 200 | 5 | 150 | +++ |
| 3 | 20 | 1,5 | 7,5 | 33,3 | 200 | 5 | 150 | +++ |
| 3 | 20 | 2,0 | 10,0 | 40,0 | 200 | 5 | 150 | +++ zuviel Polymer |
| 3 | 20 | 0,05 | 0,25 | 1,6 | 200 | 5 | 150 | +/- |
| 3 | 20 | 0,1 | 0,5 | 3,2 | 200 | 5 | 150 | +/- |
| 3 | 20 | 0,2 | 1,0 | 6,2 | 200 | 5 | 150 | + |
| 3 | 20 | 0,3 | 1,5 | 9,1 | 200 | 5 | 150 | ++ |
| 3 | 20 ¹ | 0,5 | - | 14,3 | 200 | 5 | 150 | ++ wäBr. Suspension |
| 3 | 20 ¹ | 1,0 | - | 25,0 | 200 | 5 | 150 | +++ wäBr. Suspension |

Tabelle 5

Herstellung von Probepreßlingen aus verschiedenen Polymeren und Baumwollresten und anderen Naturstof-fen.

Der Bewertungsmaßstab entspricht der Tabelle 2.

| Fasermaterial (g) | CHCl ₃ (ml) | PHD (g) | Lösung (%) | Anteil Polymer (%) | Druck (bar) | Zeit (min) | Temp.Zelle (°C) | Bemerkungen |
|----------------------|---------------------------|------------|---------------|--------------------------|----------------|---------------|--------------------|-----------------------|
| Biopol | | | | | | | | |
| 3 | 20 | 0,4 | 2 | 13,3 | 200 | 5 | 150 | + |
| 3 | 20 | 1,0 | 5 | 33,3 | 200 | 5 | 150 | +++ |
| 3 | 20 | 1,5 | 7,5 | 50,0 | 200 | 5 | 150 | +++ zuviel Polymer |
| 3 | 20 | 2,0 | 10 | 66,7 | 200 | 5 | 150 | +++ zuviel Polymer |
| Mehl | | | | | | | | |
| 3 | 20 ⁷ | 0,33 | 1,65 | 9,9 | 200 | 5 | 100 | +/- |
| 3 | 20 ⁷ | 0,75 | 3,75 | 20,0 | 200 | 5 | 100 | +/- |
| 3 | 20 ⁷ | 0,33 | 1,65 | 9,9 | 200 | 5 | 180 | + |
| 3 | 20 ⁷ | 0,75 | 3,75 | 20,0 | 200 | 5 | 180 | ++ |
| Schrot | | | | | | | | |
| 3 | 20 ⁷ | 0,33 | 1,65 | 9,9 | 200 | 5 | 100 | +/- |
| 3 | 20 ⁷ | 0,75 | 3,75 | 20,0 | 200 | 5 | 100 | +/- |
| 3 | 20 ⁷ | 0,33 | 1,65 | 9,9 | 200 | 5 | 180 | ++ |
| 3 | 20 ⁷ | 0,75 | 3,75 | 20,0 | 200 | 5 | 180 | +++ |
| Stärke | | | | | | | | |
| 3 | 20 ⁷ | 0,33 | 1,65 | 9,9 | 200 | 5 | 100 | +/- |
| 3 | 20 ⁷ | 0,75 | 3,75 | 20,0 | 200 | 5 | 100 | +/- |
| 3 | 20 ⁷ | 0,33 | 1,65 | 9,9 | 200 | 5 | 180 | + |
| 3 | 20 ⁷ | 0,75 | 3,75 | 20,0 | 200 | 5 | 180 | ++ |

⁷: analog Tabelle 4 enthaltend 18 % HV

PHD, PHB/HV mit einem Anteil von 8 mol% 3-Hydroxyvaleriansäure (3HV) und "Biopol" eines Naturstoffpolymeren mit einem Anteil von 18 mol% 3HV wurden ebenfalls in 20 ml Chloroform aufgenommen. Hierbei resultierten Suspensionen, da die Polymere schwer löslich sind.

Beispiel 3

Um Bakterien mit einem signifikanten Anteil PHF an der Zelltrockenmasse direkt ohne Isolierung des PHF zusammen mit Fasermaterial zu verpressen, wurden getrocknete Zellen von *P. putida* aus Fermentation 6 (Tabelle 1) mit einem Anteil von 62% Polymer an der Zelltrockenmasse, im Mörser zu einem Pulver zermahlen. Dieses Pulver wurde in unterschiedlichen Mengen so gut wie möglich unter die Fasern gemischt und gepreßt. Die resultierenden Preßlinge zeigten eindeutig, daß in Zonen mit viel Zellmaterial ein Zusammenhalten gewährleistet war, während in Bereichen ohne Zellmaterial das Material sehr locker war.

Um eine bessere Verteilung zu erreichen, wurden entsprechende Mengen Zellmaterial in Chloroform suspendiert, ca. 1 Stunde auf einem Rotationschüttler inkubiert und mit den Fasern vermischt. Nach Abdampfen des Chloroforms wurde das Gemisch gepreßt. Auch hier zeigten die Preßlinge keine homogene Verteilung der Zellen wodurch kein ausreichender Zusammenhalt des Material gewährleistet war.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden die entsprechenden Mengen getrockneter Zellen in Wasser resuspendiert, ca. 1 Stunde auf dem Rotationsschüttler inkubiert und anschließend mit dem Fasermaterial vermischt. Dieses Gemisch wurde dann über Nacht gefriergetrocknet und anschließend gepreßt. Die resultierenden Preßlinge zeigten eine homogene Verteilung von Zellen und Polymer, so daß dieses Verfahren als besonders geeignet zur Herstellung von Verbundmaterialien erscheint. Ein Mischungsverhältnis von 9 bis 30% Zellen, entsprechend einem Polymeranteil von 6 bis 24%, erschien für die Preßlinge als günstig. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tabelle 6

Herstellung von Probepreßlingen aus verschiedenen Fasermaterialien und getrockneten Zellen, die PHF enthalten. (Fermentation 14: PHB-Gehalt 73%; Zusammensetzung: 10 mol% 3-Hydroxybutyrat).

Die Zellen wurden in dem angegebenen Volumen (ml) Wasser resuspendiert, mit den Fasern vermischt und lyophilisiert.

Der Bewertungsmaßstab entspricht der Tabelle 2.

| Fasermaterial (g/ml) | Zellen (g) | PHB (g) | Anteil Zellen (%) | Anteil PHB (%) | Druck (bar) | Zeit (min) | Temp.Zelle (°C) | Bemerkungen |
|-------------------------|---------------|------------|-------------------------|----------------------|----------------|---------------|--------------------|-------------|
| Baumwolle | | | | | | | | |
| 3 | 0,15 | 0,11 | 4,8 | 3,5 | 200 | 10 | 180 | + |
| 3 | 0,23 | 0,17 | 7,1 | 5,3 | 200 | 10 | 180 | ++ |
| 3 | 0,3 | 0,22 | 9,1 | 6,7 | 200 | 10 | 180 | ++ |
| 3 | 0,45 | 0,33 | 13,2 | 9,6 | 200 | 10 | 180 | +++ |
| Flachs | | | | | | | | |
| 3/20 | 0,50 | 0,36 | 14,3 | 10,4 | 200 | 3 | 180 | ++ |
| 3/20 | 1,16 | 0,85 | 27,9 | 20,4 | 200 | 3 | 180 | +++ |
| Sisal | | | | | | | | |
| 3/5 | 0,50 | 0,36 | 14,3 | 10,4 | 200 | 3 | 180 | ++ |
| 3/5 | 1,16 | 0,85 | 27,9 | 20,4 | 200 | 3 | 180 | +++ |
| Hanf | | | | | | | | |
| 3/10 | 0,50 | 0,36 | 14,3 | 10,4 | 200 | 3 | 180 | ++ |
| 3/10 | 1,16 | 0,85 | 27,9 | 20,4 | 200 | 3 | 180 | +++ |

| Fasermaterial (g/ml) | Zellen (g) | PHB (g) | Anteil Zellen (%) | Anteil PHB (%) | Druck (bar) | Zeit (min) | Temp.Zelle (°C) | Bemerkungen |
|-------------------------|---------------|------------|-------------------------|----------------------|----------------|---------------|--------------------|-------------|
| Holzwolle | | | | | | | | |
| 3/10 | 0,50 | 0,36 | 14,3 | 10,4 | 200 | 3 | 180 | ++ |
| 3/10 | 1,16 | 0,85 | 27,9 | 20,4 | 200 | 3 | 180 | +++ |
| Watte | | | | | | | | |
| 3/10 | 0,50 | 0,36 | 14,3 | 10,4 | 200 | 3 | 180 | ++ |
| 3/10 | 1,16 | 0,85 | 27,9 | 20,4 | 200 | 3 | 180 | +++ |
| Heu | | | | | | | | |
| 3/5 | 0,50 | 0,36 | 14,3 | 10,4 | 200 | 3 | 180 | ++ |
| 3/5 | 1,16 | 0,85 | 27,9 | 20,4 | 200 | 3 | 180 | +++ |
| Stroh | | | | | | | | |
| 3/5 | 0,50 | 0,36 | 14,3 | 10,4 | 200 | 3 | 180 | ++ |
| 3/5 | 1,16 | 0,85 | 27,9 | 20,4 | 200 | 3 | 180 | +++ |
| Sägemehl | | | | | | | | |
| 6/10 | 1,00 | 0,73 | 14,3 | 10,4 | 200 | 3 | 180 | ++ |
| 6/10 | 2,32 | 1,69 | 27,9 | 20,4 | 200 | 3 | 180 | +++ |
| Hobelspäne | | | | | | | | |
| 6/10 | 1,00 | 0,73 | 14,3 | 10,4 | 200 | 3 | 180 | ++ |
| 6/10 | 2,32 | 1,69 | 27,9 | 20,4 | 200 | 3 | 180 | +++ |
| Kiefernspäne | | | | | | | | |
| 6/10 | 1,00 | 0,73 | 14,3 | 10,4 | 200 | 3 | 180 | ++ |
| 6/10 | 2,32 | 1,69 | 27,9 | 20,4 | 200 | 3 | 180 | +++ |

| Fasermaterial (g/ml) | Zellen (g) | PHB (g) | Anteil Zellen (%) | Anteil PHB (%) | Druck (bar) | Zeit (min) | Temp.Zelle (°C) | Bemerkungen |
|-------------------------|---------------|------------|-------------------------|----------------------|----------------|---------------|--------------------|-------------|
| Spelzen | | | | | | | | |
| 6/10 | 1,00 | 0,73 | 14,3 | 10,4 | 200 | 3 | 180 | ++ |
| 6/10 | 2,32 | 1,69 | 27,9 | 20,4 | 200 | 3 | 180 | +++ |
| Samenreste | | | | | | | | |
| 12/5 | 2,00 | 1,46 | 14,3 | 10,4 | 200 | 3 | 75 | +/- |
| 12/5 | 4,64 | 3,39 | 27,9 | 20,4 | 200 | 3 | 75 | +/- |
| Haferflocken | | | | | | | | |
| 12/10 | 2,00 | 1,46 | 14,3 | 10,4 | 200 | 3 | 75 | + |
| 12/10 | 4,64 | 3,39 | 27,9 | 20,4 | 200 | 3 | 75 | + |
| Roggen | | | | | | | | |
| 12/10 | 2,00 | 1,46 | 14,3 | 10,4 | 200 | 3 | 75 | + |
| Kleie | | | | | | | | |
| 6/10 | 1,00 | 0,73 | 14,3 | 10,4 | 200 | 3 | 180 | ++ |
| 6/10 | 2,32 | 1,69 | 27,9 | 20,4 | 200 | 3 | 180 | +++ |
| Papierstreifen | | | | | | | | |
| 6/10 | 1,00 | 0,73 | 14,3 | 10,4 | 200 | 3 | 180 | ++ |
| 6/10 | 2,32 | 1,69 | 27,9 | 20,4 | 200 | 3 | 180 | +++ |

Beispiel 4

Analog Beispiel 3 wurden Preßlinge aus Fasermaterialien und getrockneten Zellen, die PHD gespeichert hatten (Fermentation 6) hergestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tabelle 7

Herstellung von Probepreßlingen aus verschiedenen Fasermaterialien und getrockneten Zellen, die PHF gespeichert hatten. (Fermentation 6; PHD-Gehalt 62% mit der Zusammensetzung 3 mol % 3-Hydroxyhexanoat, 20 mol% 3-Hydroxyoctanoat, 75 mol% 3-Hydroxydecanoat und 2 mol% 3-Hydroxydodecanoat). Der Bewertungsmaßstab entspricht der Tabelle 2.

| Fasermaterial (g/ml) | Zellen (g) | PHD (g) | Anteil Zellen (%) | Anteil PHD (%) | Druck (bar) | Zeit (min) | Temp.Zelle (°C) | Bemerkungen |
|-------------------------|---|------------|-------------------------|----------------------|----------------|---------------|--------------------|-------------------------------------|
| Baumwollreste | Getrocknete Zellen aus Fermentation 6 wurden in Fasermaterial verteilt | | | | | | | |
| 3/20 | 0,15 | 0,09 | 4,8 | 2,9 | 200 | 10 | 75 | - keine homogene Verteilung |
| 3/20 | 9,23 | 0,14 | 7,1 | 4,3 | 200 | 10 | 75 | +/- keine homogene Verteilung |
| 3/20 | 0,30 | 0,19 | 9,1 | 5,7 | 200 | 10 | 75 | +/- keine homogene Verteilung |
| 3/20 | 0,45 | 0,28 | 13,0 | 8,1 | 200 | 10 | 75 | - keine homogene Verteilung |
| 3/20 | 0,60 | 0,37 | 16,7 | 11,3 | 200 | 10 | 75 | + keine homogene Verteilung |
| | Zellen aus Fermentation 6 wurden in 10 ml Chloroform resuspendiert, mit den Fasern vermischt und nach dem Trocknen gepresst. | | | | | | | |
| 3/20 | 0,15 | 0,09 | 4,8 | 2,9 | 200 | 10 | 75 | - keine homogene Verteilung |

| Fasermaterial (g/ml) | Zellen (g) | PHD (g) | Anteil Zellen (%) | Anteil PHD (%) | Druck (bar) | Zeit (min) | Temp.Zelle (°C) | Bemerkungen |
|--|---------------|------------|-------------------------|----------------------|----------------|---------------|--------------------|-------------------------------------|
| 3/20 | 0,23 | 0,14 | 7,1 | 4,3 | 200 | 10 | 75 | - keine homogene Verteilung |
| 3/20 | 0,30 | 0,19 | 9,1 | 5,7 | 200 | 10 | 75 | - keine homogene Verteilung |
| 3/20 | 0,45 | 0,28 | 13,0 | 8,1 | 200 | 10 | 75 | +/- keine homogene Verteilung |
| 3/20 | 0,60 | 0,37 | 16,7 | 11,3 | 200 | 10 | 75 | + keine homogene Verteilung |
| Zellen aus Fermentation 6 wurden in 10 ml Wasser resuspendiert, mit den Fasern vermischt und lyophilisiert. | | | | | | | | |
| 3/20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 200 | 10 | 75 | - Blindprobe |
| 3/20 | 0,15 | 0,09 | 4,8 | 2,9 | 200 | 10 | 75 | - |
| 3/20 | 0,23 | 0,14 | 7,1 | 4,3 | 200 | 10 | 75 | +/- |
| 3/20 | 0,30 | 0,19 | 9,1 | 5,7 | 200 | 10 | 75 | + |
| 3/20 | 0,45 | 0,28 | 13,0 | 8,1 | 200 | 10 | 75 | ++ |
| 3/20 | 0,60 | 0,37 | 16,7 | 11,3 | 200 | 10 | 75 | +++ |
| 3/20 | 0,90 | 0,56 | 23,1 | 14,3 | 200 | 10 | 75 | +++ |
| 3/20 | 1,2 | 0,74 | 28,6 | 17,6 | 200 | 10 | 75 | +++ |

| Fasermaterial (g/ml) | Zellen (g) | PHD (g) | Anteil Zellen (%) | Anteil PHD (%) | Druck (bar) | Zeit (min) | Temp.Zelle (°C) | Bemerkungen |
|-------------------------|---------------|------------|-------------------------|----------------------|----------------|---------------|--------------------|--------------|
| Flachs | | | | | | | | |
| 3/20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 200 | 10 | 75 | - Blindprobe |
| 3/20 | 0,15 | 0,09 | 4,8 | 2,9 | 200 | 10 | 75 | - Blindprobe |
| 3/20 | 0,23 | 0,14 | 7,1 | 4,3 | 200 | 10 | 75 | +/- |
| 3/20 | 0,30 | 0,19 | 9,1 | 5,7 | 200 | 10 | 75 | + |
| 3/20 | 0,45 | 0,28 | 13,0 | 8,1 | 200 | 10 | 75 | ++ |
| 3/20 | 0,60 | 0,37 | 16,7 | 11,3 | 200 | 10 | 75 | +++ |
| 3/20 | 0,90 | 0,56 | 23,1 | 14,3 | 200 | 10 | 75 | +++ |
| 3/20 | 1,2 | 0,74 | 28,6 | 17,6 | 200 | 10 | 75 | +++ |
| 3/20 | 0,58 | 0,36 | 16,2 | 10,0 | 200 | 3 | 75 | ++ |
| 3/20 | 1,45 | 0,90 | 32,6 | 20,2 | 200 | 3 | 75 | +++ |
| Sisal | | | | | | | | |
| 3/5 | 0,58 | 0,36 | 16,2 | 10,0 | 200 | 3 | 75 | ++ |
| 3/5 | 1,45 | 0,90 | 32,6 | 20,2 | 200 | 3 | 75 | +++ |
| Hanf | | | | | | | | |
| 3/10 | 0,58 | 0,36 | 16,2 | 10,0 | 200 | 3 | 75 | ++ |
| 3/10 | 1,45 | 0,90 | 32,6 | 20,2 | 200 | 3 | 75 | +++ |
| Holzwolle | | | | | | | | |
| 3/10 | 0,58 | 0,36 | 16,2 | 10,0 | 200 | 3 | 75 | + |
| 3/10 | 1,45 | 0,90 | 32,6 | 20,2 | 200 | 3 | 75 | +++ |

| Fasermaterial (g/ml) | Zellen (g) | PHD (g) | Anteil Zellen (%) | Anteil PHD (%) | Druck (bar) | Zeit (min) | Temp.Zelle (°C) | Bemerkungen |
|-------------------------|---------------|------------|-------------------------|----------------------|----------------|---------------|--------------------|-------------|
| Watte | | | | | | | | |
| 3/10 | 0,58 | 0,36 | 16,2 | 10,0 | 200 | 3 | 75 | ++ |
| 3/10 | 1,45 | 0,90 | 32,6 | 20,2 | 200 | 3 | 75 | +++ |
| Heu | | | | | | | | |
| 3/5 | 0,58 | 0,36 | 16,2 | 10,0 | 200 | 3 | 75 | + |
| 3/5 | 1,45 | 0,90 | 32,6 | 20,2 | 200 | 3 | 75 | +++ |
| Stroh | | | | | | | | |
| 3/5 | 0,58 | 0,36 | 16,2 | 10,0 | 200 | 3 | 75 | + |
| 3/5 | 1,45 | 0,90 | 32,6 | 20,2 | 200 | 3 | 75 | +++ |
| Sägemehl | | | | | | | | |
| 6/10 | 1,16 | 0,72 | 16,2 | 10,0 | 200 | 3 | 75 | ++ |
| 6/10 | 2,90 | 1,80 | 32,6 | 20,2 | 200 | 3 | 75 | +++ |
| Kobelspäne | | | | | | | | |
| 6/10 | 1,16 | 0,72 | 16,2 | 10,0 | 200 | 3 | 75 | ++ |
| 6/10 | 2,90 | 1,80 | 32,6 | 20,2 | 200 | 3 | 75 | +++ |
| Kiefernspäne | | | | | | | | |
| 6/10 | 1,16 | 0,72 | 16,2 | 10,0 | 200 | 3 | 75 | ++ |
| 6/10 | 2,90 | 1,80 | 32,6 | 20,2 | 200 | 3 | 75 | +++ |
| Spelzen | | | | | | | | |
| 6/10 | 1,16 | 0,72 | 16,2 | 10,0 | 200 | 3 | 75 | ++ |
| 6/10 | 2,90 | 1,80 | 32,6 | 20,2 | 200 | 3 | 75 | +++ |
| Samenreste | | | | | | | | |
| 12/5 | 2,32 | 1,44 | 16,2 | 10,0 | 200 | 3 | 75 | + |
| 12/5 | 5,80 | 3,60 | 32,6 | 20,2 | 200 | 3 | 75 | ++ |

| Fasermaterial (g/ml) | Zellen (g) | PHD (-g) | Anteil Zellen (%) | Anteil PHD (%) | Druck (bar) | Zeit (min) | Temp.Zelle (°C) | Bemerkungen |
|-------------------------|---------------|-------------|-------------------------|----------------------|----------------|---------------|--------------------|-------------|
| Haferflocken | | | | | | | | |
| 12/10 | 2,32 | 1,44 | 16,2 | 10,0 | 200 | 3 | 75 | + |
| 12/10 | 5,80 | 3,60 | 32,6 | 20,2 | 200 | 3 | 75 | ++ |
| Roggen | | | | | | | | |
| 12/10 | 2,32 | 1,44 | 16,2 | 10,0 | 200 | 3 | 75 | + |
| 12/10 | 5,80 | 3,60 | 32,6 | 20,2 | 200 | 3 | 75 | ++ |
| Kleie | | | | | | | | |
| 6/10 | 1,16 | 0,72 | 16,2 | 10,0 | 200 | 3 | 75 | ++ |
| 6/10 | 2,90 | 1,80 | 32,6 | 20,2 | 200 | 3 | 75 | +++ |
| Papierstreifen | | | | | | | | |
| 6/10 | 1,16 | 0,72 | 16,2 | 10,0 | 200 | 3 | 75 | ++ |
| 6/10 | 2,90 | 1,80 | 32,6 | 20,2 | 200 | 3 | 75 | +++ |

Beispiel 5

Analog dem Vorgehen aus Beispiel 3 wurde die Kulturbrühe von Bakterien direkt, daß heißt ohne Lyophilisieren und nachfolgendem Resuspendieren mit dem Fasermaterial vermischt, gefriergetrocknet und anschließend verpreßt. Geeignete Mikroorganismen sind der Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8

Der Bewertungsmaßstab entspricht der Tabelle 2.

| Bakterium | Substrat | Faseranteil | Bewertung |
|------------------|----------|---------------|-----------|
| - | - | Baumwollreste | - |
| Rh.ruber | Glucose | Baumwollreste | +++ |
| Rh.ruber | Glucose | Baumwollreste | + |
| M.extorquens 865 | Methanol | Baumwollreste | + |
| M.extorquens 865 | Methanol | Baumwollreste | +/- |
| M.rhodesianum | Methanol | Baumwollreste | +/- |
| A.eutrophus H16 | Gluconat | Baumwollreste | ++ |
| A.eutrophus H16 | Gluconat | Baumwollreste | ++ |
| P.sp.GP4BH1 | Gluconat | Baumwollreste | +++ |
| P.sp.DSM1650 | Gluconat | Baumwollreste | +++ |
| P.putida KT2440 | Gluconat | Baumwollreste | - |
| P.putida KT2440 | Octanoat | Baumwollreste | - |

Bei zusätzlichem Aufschluß der Mikroorganismen vor dem Vermischen durch Behandlung mit Ultraschall zeigten die Preßlinge aus Ansätzen mit *M. extorquens* B65" + +".

Beispiel 6

Zur Untersuchung der Verwertung von Cellulosesubstraten von zur Speicherung von PHF befähigten Bakterien gemäß Beispiel 5, wurden diese auf verschiedenen cellulosehaltigen Materialien angezogen. In flüssiges Mineralmedium wurden verschiedene autoklavierte Fasermaterialien gegeben und mit Bakterien von frischen NB-Agarkulturen angeimpft. Anhand der zunehmenden Trübung der Lösung, die auch durch das Wachstum der Bakterien hervorgerufen sein konnte, wurde auf ein verwertbares Substrat in der Nährlösung geschlossen werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

5

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabelle 9

Verwertung von cellulosehaltigen Fasermaterialien durch verschiedene Bakterien gemäß Beispiel 5

Der Bewertungsmaßstab entspricht der Tabelle 2.

| Substrat | P. fluorescens var. cellulosa | | | | | | C. flm | | | | | | Rh. ruber | | | | | | S. marcescens | | | | | |
|-------------------------------|-------------------------------|-----|------|------|-----|-----|--------|-----|------|-----|-----|-----|-----------|------|----|-----|------|----|---------------|----|--|--|--|--|
| | 1d | 2d | 4d | 7d | 1d | 2d | 4d | 7d | 1d | 2d | 4d | 7d | 1d | 2d | 4d | 7d | 1d | 2d | 4d | 7d | | | | |
| 1,0 % Glucose | +++ | | | | +++ | | | | ++ | +++ | | | | +++ | | | +++ | | | | | | | |
| 0,1 % Octanoat | - | - | - | - | - | - | +/- | +/- | n.b. | | | | | n.b. | | | n.b. | | | | | | | |
| Whatmanpapier | +/- | +++ | +++A | | + | +++ | +++A | | +/- | +/- | +/- | +/- | + | ++ | ++ | ++ | + | ++ | +++ | | | | | |
| Whatmanpapier -YE | +/- | +/- | + | +++A | - | - | - | - | + | ++ | ++ | ++ | | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | | | | | | |
| Whatmanpapier + 1,0% Glucose | ++ | +++ | | | +++ | | | | + | ++ | ++ | ++ | | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | | | | | | |
| Whatmanpapier + 0,1% Octanoat | - | - | - | - | - | - | +/- | +/- | n.b. | | | | | n.b. | | | n.b. | | | | | | | |
| Watte | - | - | +/- | + | +/- | + | + | +++ | +/- | +/- | +/- | +/- | + | ++ | ++ | ++ | + | ++ | +++ | | | | | |
| Baumwolle | - | +/- | + | ++ | +/- | + | ++ | ++ | +/- | +/- | +/- | +/- | + | ++ | ++ | ++ | + | ++ | +++ | | | | | |
| Baumwolle + 1,0% Glucose | +++ | | | | ++ | +++ | | | +/- | +/- | +/- | +/- | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | | | | | | |
| Baumwolle + 0,1% Octanoat | - | - | - | - | +/- | +/- | +/- | + | n.b. | | | | | n.b. | | | n.b. | | | | | | | |
| Flache | - | +/- | ++ | +++A | +/- | +/- | ++ | ++ | - | - | +/- | +/- | + | - | - | +/- | + | ++ | ++ | ++ | | | | |

Tabelle 9 (Fortsetzung)

| Substrat | P. fluorescens var. cellulosa | | | | | | C. fimi | | | | Rh. ruber | | | | S. marcescens | | | |
|----------------|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|---------|-----|------|----|-----------|-----|------|----|---------------|----|--|--|
| | 1d | 2d | 4d | 7d | 1d | 2d | 4d | 7d | 1d | 2d | 4d | 7d | 1d | 2d | 4d | 7d | | |
| Sisal | + | + | + | ++ | + | + | ++ | ++ | - | - | +/- | +/- | + | ++ | ++ | ++ | | |
| Holzwohle | - | - | - | - | +/- | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| Stroh | + | + | ++ | ++ | +/- | + | ++ | +++ | n.b. | | | | n.b. | | | | | |
| Heu | +/- | ++ | ++ | +++ | +/- | + | ++ | ++ | n.b. | | | | n.b. | | | | | |
| Laserausdruck | + | +++ | +++ | +++ | + | +++ | | | n.b. | | | | n.b. | | | | | |
| Papierhandruch | +/- | ++ | +++ | +++ | + | +++ | +++ | +++ | n.b. | | | | n.b. | | | | | |
| Illustrierte | +/- | + | +++ | +++ | + | + | +++ | +++ | n.b. | | | | n.b. | | | | | |
| Tageszeitung | +/- | + | + | ++ | +/- | +/- | + | + | n.b. | | | | n.b. | | | | | |

*, Bakterien haften an dem Fasermaterial; a, erste Auflösungserscheinungen sind sichtbar; A Cellulosesubstrat ist vollständig aufgelöst; d, Tage; YE, Hefeextrakt, n.b., nicht bestimmt.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Die vollständige Zersetzung von Cellulosematerial wurde nur bei *P. fluorescens* var. *cellulosa* und *Cellulomonas fimi* bei Anzucht auf bestimmten Substraten beobachtet (Tabelle 9). Von den untersuchten Substraten wurden insbesondere Whatmanpapier (spezielles Laborlöschpapier) und Laserausdrucke auf weißem Papier von beiden Organismen innerhalb von vier Tagen vollständig aufgelöst und abgebaut. Innerhalb von einer Woche löste *P. fluorescens* var. *cellulosa* auch Flachs auf. Weitere nutzbare Substrate sind Illustriertenpapier und Recycling-Papierhandtücher, wohingegen bei Baumwollresten, Watte, Sisal, Holzwolle und anderen Substraten keine Auflösungserscheinungen innerhalb von einer Woche erkennbar waren (Tabelle 9). Teilweise war allerdings auch auf den makroskopisch nicht zersetzten Substraten ein Wachstum der Kultur in Form von einer Trübungszunahme erkennbar (Tabelle 9). Octansäure hemmt das Wachstum beider Bakterien. Ohne Hefeextrakt konnte *C. fimi* nicht wachsen, das Wachstum von *P. fluorescens* var. *cellulosa* war ohne Hefeextrakt verlangsamt (Tabelle 9).

Das mikroskopische Bild zeigte, daß sich *P. fluorescens* var. *cellulosa* während des Wachstums an die Cellulosefasern anheftete, während dies bei *C. fimi* nicht der Fall war. Beide Stämme wurden als celluloseverwertende Referenzstämme von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ) bezogen. *C. fimi* speicherte auf allen getesteten Substraten kein PHF, während *P. fluorescens* var. *cellulosa* nur äußerst geringe Mengen PHD (ca. 1% der Zelltrockenmasse synthetisierte). Dieser geringe Anteil reichte nicht zum Verkleben von Fasern aus.

Bei allen anderen untersuchten Bakterien, die ein geringfügiges Wachstum auf den getesteten Substraten zeigten, blieb das Cellulosematerial makroskopisch unverändert, der Zellertrag war niedrig und PHF konnten gaschromatographisch nicht nachgewiesen werden (Tabelle 9). Da die meisten der eingesetzten Materialien Naturstoffe darstellen (Sisal, Flachs, Stroh, Heu) oder anderweitig heterogen zusammengesetzt sind (Baumwollreste, bedrucktes Papier), enthalten diese eine Vielzahl von Substanzen neben dem Grundstoff Cellulose. Diese werden möglicherweise durch verschiedene Bakterien verwertet und als Wachstumssubstrat genutzt. Desweiteren führen chemische Aufbereitungsprozesse bei der Herstellung der Endprodukte möglicherweise zu einer leichteren oder erschwerten Verwertbarkeit. Die Ursache für das beobachtete Zellwachstum einiger *Pseudomonaden* auf Baumwollresten, Whatmanpapier oder Flachs durch einen Abbau von Cellulose oder von Verunreinigungen innerhalb des Fasermaterials beruht, könnte daher nur durch vollständige Zersetzung der Cellulose belegt werden. Da Cellulose aus kristallinen und amorphen Bereichen besteht, die unterschiedlich gut durch Bakterien verwertet werden können, ist möglicherweise auch der Anteil dieser Bereiche innerhalb der Fasern für eine eingeschränkte Verwertbarkeit und ein eingeschränktes Wachstum verantwortlich. Eine Behandlung der Cellulosefasern, beispielsweise durch Natronlauge, vor der Verwendung als Substrat sollte die Verwertbarkeit fördern.

Wurden die oben beschriebenen Kulturen, die Fasermaterialien enthalten, mit Glucose nachgefüttert, setzte sofortiges Wachstum ein und die unterschiedlichen Stämme waren nach etwa 24 Stunden ausgewachsen. Granulate aus akkumulierten Polymeren waren dann nach 24 bis 48 Stunden unter dem Mikroskop im Phasenkontrast sichtbar. Bezüglich des makroskopischen Erscheinungsbildes konnten deutlich zwei Formen unterschieden werden. Die Mehrzahl der Kulturen enthielt dann homogene Bakteriensuspensionen, in denen die Zellen nicht an den Fasern anhafteten. Einige wenige Stämme bildeten dagegen sowohl Aggregate, die nur aus Zellen bestehen, wie auch Aggregate, die aus Zellen und Fasern bestehen. Dies sind *P.sp. GP4BH1*, das PHB und PHD speichern kann (Steinbüchel und Wiese (1992) "A *Pseudomonas* strain accumulating polyesters of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 691—697) und *Rhodococcus ruber* in der Fähigkeit zur Akkumulation von PHB/HV. Im Falle von *Rh. ruber* forderte die Zugabe von Thiamin oder Hefeextrakt als Supplinen das Wachstum. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 10 zusammengefaßt.

Tabelle 10

Der Bewertungsmaßstab entspricht der Tabelle 2.

| Bakterium | Substrat | Faseranteil | Bewertung/Bemerkungen | |
|-------------------|----------|-----------------------|-----------------------|----|
| Rh. ruber | Glucose | Flachs | +++ | 5 |
| Rh. ruber | Glucose | Watte | ++ | 10 |
| Rh. ruber | Glucose | Baumwollreste | ++ | |
| Rh. ruber | Glucose | Flachs | +++ | 15 |
| M. extroquens 865 | Methanol | Flachs | +++ | |
| M. extroquens 865 | Methanol | Flachs | +++ | |
| M. extroquens 865 | Methanol | Baumwollreste | ++ | 20 |
| M. extroquens 865 | Methanol | Baumwollreste | + | |
| M. rhodesianum | Methanol | Baumwollreste | +++ | 25 |
| M. rhodesianum | Methanol | Baumwollreste | + | |
| P. sp. GP48H1 | Gluconat | Flachs | + | 30 |
| P. sp. GP48H1 | Gluconat | Baumwollreste | +++ | |
| P. putida KT2440 | Gluconat | Baumwollreste | - | |
| P. citronellolis | Gluconat | Baumwollreste | - | 35 |
| A. eutrophus H16 | Gluconat | Baumwollreste | +++ | |
| A. eutrophus H16 | Gluconat | Baumwollreste (t=48h) | +++ | 40 |
| A. eutrophus H16 | Gluconat | Baumwollreste | +++ | |
| A. eutrophus H16 | Gluconat | Baumwollreste (t=48h) | +++ | |
| A. eutrophus H16 | Gluconat | Watte | +++ | 45 |
| A. eutrophus H16 | Gluconat | Holzwole | +++ | |
| A. eutrophus H16 | Gluconat | Flachs | +++ | 50 |
| A. eutrophus H16 | Gluconat | Sisal | +++ | |

Patentansprüche

1. Verbundwerkstoff aus Fasermaterial und Bindemittel, dadurch gekennzeichnet, daß das Bindemittel aus einem Polymer von Hydroxyfettsäuren besteht.
2. Verbundwerkstoff nach Anspruch 1, wobei das Fasermaterial ausgewählt ist aus Flachs, Sisal, Hanf, Holzwole, Holzschliff, Holzfasern, Kokosfasern, Leder, Watte, Heu, Stroh, Sägemehl, Hobelspänen, Kiefernspänen, Spelzen, Samenresten, Haferflocken, Getreide, Kleie, Papierstreifen, Baumwollresten, Kunstfasern wie Polybutylenterephthalate, Polyethylenterephthalate, Nylon 6, Nylon 66, Nylon 12, Viskose und Rayon.
3. Verbundwerkstoff nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Monomere der Hydroxyfettsäuren des Polymers von gesättigten oder ungesättigten 3-Hydroxyfettsäuren mit 4 bis 16 Kohlenstoffatomen abgeleitet im Fettsäurerest sind.
4. Verbundwerkstoff nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Polymer von Hydroxyfettsäuren aus Monomeren einer oder verschiedener Hydroxyfettsäuren besteht.

5. Verbundwerkstoffe nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Polymer von Hydroxyfettsäuren aus Poly-3-hydroxybuttersäure (PHB), Copolymer Poly-3-hydroxybuttersäure-3-Hydroxyvaleriansäure (PHB/HV) und Poly-3-hydroxydekansäure oder Gemischen derselben besteht.

6. Verbundwerkstoff nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Gehalt an Polymer von Hydroxyfettsäuren des Verbundwerkstoffs 5 — 50 Gew.-%, vorzugsweise 10—35 Gew.-% beträgt.

7. Verwendung eines Verbundwerkstoffes wie in einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 definiert zur Herstellung von Formteilen im Automobilbereich, insbesondere zu akustischen Dämpfung in den Bereichen Motorhaube, Stirnwand (beidseitig), Tunnel, Tür, Dach, Fußraum, Pumpen, A- bis D-Säule und Lüftungskanal und als gegebenenfalls selbsttragende Basis für Innenauskleidungen, insbesondere für Armaturenabdeckungen Tunnelverkleidungen, Türverkleidungen, Rückenlehnenverkleidungen, A- bis D-Säulenverkleidungen und Reserveradabdeckungen sowie als Teile mit Doppelfunktion insbesondere als Dachhimmel, Huta- blage, Füllstück, Kofferraummatte oder Radhausverkleidung.

8. Verfahren zur Herstellung des Verbundwerkstoffes, gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1—8, dadurch gekennzeichnet, daß das Fasermaterial mit dem Bindemittel in Kontakt gebracht und anschließend zu dem Verbundwerkstoff verpreßt wird.

9. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Fasermaterial mit isoliertem und gereinigtem Polymer aus Hydroxyfettsäuren vermischt wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Fasermaterial mit getrockneten Polymer aus Hydroxyfettsäuren-enthaltenden Mikroorganismen oder einer Paste derselben vermischt wird.

11. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß Polymer aus Hydroxyfettsäuren-produzierende Mikroorganismen in Anwesenheit von Fasermaterial und einer weiteren Kohlenstoffquelle angezogen, die Bakterien mit samt den Fasern geerntet und im getrockneten oder feuchten Zustand, gegebenenfalls unter Einsatz weiteren Fasermaterials zu Verbundwerkstoffen gepreßt werden.

12. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß Polymer aus Hydroxyfettsäuren-produzierende Mikroorganismen in Anwesenheit von Fasermaterial ohne weitere Kohlenstoffquelle angezogen werden, wobei die Bakterien einen Teil des Fasermaterials als Kohlenstoffquelle verwerten, die Bakterien mit samt den Fasern geerntet werden und im getrockneten oder feuchten Zustand, gegebenenfalls unter Einsatz weiteren Fasermaterials zu Verbundwerkstoffen gepreßt werden.

13. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß als Mikroorganismus ein PHF-Synthesegen-exprimierender rekombinanter Mikroorganismus eingesetzt wird.